

PCT/JP 2004/014037

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

17. 9. 2004

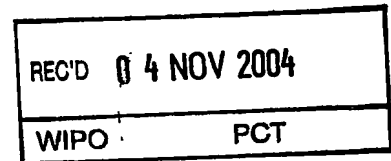
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 9 月 3 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 4 2 1 6 5
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 3 4 2 1 6 5]

出 願 人 三井化学株式会社
Applicant(s):

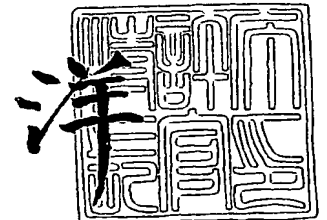


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 5 5 0 8

【書類名】 特許願
【整理番号】 P0002578
【提出日】 平成15年 9月30日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 1/00
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 和田 光史
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 及川 利洋
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 望月 大資
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 徳田 淳子
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 川嶋 美由貴
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 安楽城 正
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 阿部 玲子
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 三宅 仁基
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内
 【氏名】 高橋 均
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社内
 【氏名】 澤井 秀樹
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社内
 【氏名】 耳塚 孝
【特許出願人】
 【識別番号】 000005887
 【氏名又は名称】 三井化学株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100123788
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 宮崎 昭夫
 【電話番号】 03-3585-1882
【選任した代理人】
 【識別番号】 100088328
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 金田 暢之

【選任した代理人】
 【識別番号】 100106297
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】
 【識別番号】 100106138
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 201087
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

大腸菌由来 D-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) 活性が増強され、かつピルベートデヒドロゲナーゼ (pdh) 活性が低減化された細菌。

【請求項 2】

ピルベートホルメートリアーゼ (pf1) 活性が低減化された請求項 1 に記載の細菌。

【請求項 3】

細菌が大腸菌である請求項 1 又は 2 に記載の細菌。

【請求項 4】

大腸菌が MT-10934 株 (FERM P-19092) である請求項 3 に記載の大腸菌。

【請求項 5】

大腸菌由来 D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性の増強が、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターの下流に大腸菌由来 D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が連結されている発現カセットを用いることを特徴とする請求項 1～4 の何れか一項に記載の細菌。

【請求項 6】

請求項 1～5 の何れか一項に記載の細菌または組み換え大腸菌を培養することにより得られる培養物、菌体及びその処理物。

【請求項 7】

請求項 1～5 の何れか一項に記載の細菌または大腸菌を培養し、得られた培養物から D-乳酸を回収することを特徴とする、D-乳酸の生産方法。

【請求項 8】

大腸菌由来 D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性が増強され、かつピルベートホルメートリアーゼ活性が低減化された細菌を培養し、得られた培養物から D-乳酸を回収することを特徴とする、D-乳酸の生産方法。

【請求項 9】

細菌が大腸菌である請求項 8 に記載の D-乳酸の生産方法。

【請求項 10】

2 種以上のアミノ酸が添加された培地で培養することを特徴とする、請求項 7～9 に記載の D-乳酸の生産方法。

【請求項 11】

通気条件下で培養することを特徴とする請求項 7～10 の何れか一項に記載の D-乳酸の生産方法。

【請求項 12】

通気条件が温度 30℃ の水を対象とした場合常圧で酸素移動容量係数 $k_L a$ が 1 h^{-1} 以上 400 h^{-1} 以下となるような条件で達成し得る酸素供給を可能とする条件であることを特徴とする請求項 11 に記載の D-乳酸の生産方法。

【請求項 13】

培養 pH が 6～8 であることを特徴とする請求項 7～12 の何れか一項に記載の D-乳酸の生産方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高純度なD-乳酸を高生産する細菌

【技術分野】

【0001】

本発明は高純度なD-乳酸を生産する細菌に関わる。また、本発明は微生物を培養して、培地にD-乳酸を生成蓄積させることを特徴とするD-乳酸の製造法に関し、詳しくは純度が高い、特にピルビン酸の生成蓄積量が少ないD-乳酸の効率的な製造法に関わる。

【背景技術】

【0002】

生分解性ポリマーであるポリ乳酸は、CO₂問題・エネルギー問題の顕在化とともにサステナビリティ（持続可能性）、LCA（ライフサイクルアセスメント）対応型製品として強い注目を浴びており、その原料である乳酸には効率的で安価な製造法が求められている。ちなみに現在生産されているポリ乳酸はL-乳酸ポリマーであるが、乳酸にはL-乳酸（以下、L体と略することがある）とD-乳酸（以下、D体と略することがある）の2種類の光学異性体があり、D体についてもポリマー原料や農薬、医薬の中間体として近年注目が集まりつつある。但しいずれの用途においても、原料たるL体、D体には高い純度要求されるのが事実である。

【0003】

自然界には乳酸菌などの乳酸を効率良く生産する細菌が存在し、それらを用いた乳酸製造法の中には既に実用化されているものもある。例えば、L体を効率良く生産させる細菌として *Lactobacillus delbrueckii* などがあり、D体を効率良く生産させる細菌として *Sporolactobacillus* 属の微生物などが知られている。いずれの場合も嫌気培養で乳酸の蓄積量は高いレベルに達しているが、培養液中に含まれる乳酸以外の副生物、例えば酢酸、エタノール、アセトイン、ピルビン酸といった化合物が精製過程で除けずに、最終産物である乳酸の品質低下につながることもある。

【0004】

そのような乳酸の純度低下を回避するには、細菌によって生産される副生物の量を低減化させることが最も効果的である。近年発展してきた遺伝子組換え技術を利用して微生物の特定遺伝子を破壊すれば、狙った副生物の生産を特異的に阻害することが可能となってきた。ただ現状的には、遺伝子破壊法がどのような細菌にでも容易に適応できる訳ではなく、乳酸菌など元来乳酸を高生産できる細菌での適応は困難である。なぜなら乳酸菌はゲノム情報が必ずしも十分とは言えず、遺伝子組換えの宿主としても汎用されていないからである。

【0005】

それに対しゲノム情報が豊富で、遺伝子組換え宿主としての実績が十分にある細菌として大腸菌が挙げられる。

【0006】

ゾウら [Zhou, S., Appl. Environ. Microbiol., (2003) 69, 399-407] の報告によれば、ピルベートホルメトリアーゼ (pflB)、フマル酸レダクターゼ (frdABCD) (以下 frd と略することがある)、アルコール/アルデヒドデヒドロゲナーゼ (以下 adeE と略することがある)、およびアセテートキナーゼ (以下 ackA と略することがある) の4重破壊大腸菌を5%のグルコースを含む無機塩培地で嫌気条件下にて168時間培養することによって、48.5 g/LのD体が生産され、培地中のコハク酸、蟻酸、酢酸、エタノールといった副生物量が顕著に低減化されている。しかしながら、ピルビン酸については言及がなく、ピルビン酸生産能の低減化効果については不明である。ピルビン酸はD体の代謝反応前駆体であるため、例えばホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への反応を触媒する酵素を破壊すると、ピルビン酸蓄積量は低下するであろうが同時にD体蓄積量も低下するといった好ましからざる結果を招くことが予想される。一般にピルビン酸が乳酸モノマー原料に不純物として含まれた場合には、ポリマー重合率が低下する等の好ましからざる問題が生じることは当業者には良く知られた事実であり、その意味からも

ピルビン酸はぜひとも低減化すべき副生物の一つである。にも拘わらずD体蓄積量を低下させることなく、ピルビン酸蓄積量を低下させることに成功したという報告は過去になされていない。バンチら [Bunch, PK., Microbiology, (1997) 143, 187-195] はこの論文の中で、大腸菌由来のD-乳酸デヒドロゲナーゼ (以下、ldhAと呼ぶことがある) をコードする遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列を決定している。そしてldhA発現プラスミドを導入した大腸菌を、0.4%グルコースを含むM9最小培地で通気培養し、増殖が阻害されること、更にその増殖阻害がカザミノ酸添加により部分的に、アラニンの添加によりほぼ完全に回復することを報告している。しかしながら結局のところldhA過剰発現によってD体やピルビン酸の蓄積量がどう変化するのかを直接示すデータを開示してはいない。

【0007】

また大腸菌以外の細菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ (以下、ldhと呼ぶことがある) を大腸菌に過剰発現させた例としては、Lactobacillus helveticus由来ldhの発現例としてコッカーら [Kochhar, S., Eur. J. Biochem., (1992) 208, 799-805] やLactobacillus bulgaricus由来ldhの発現例としてコッカーら [Kochhar, S., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1992) 185, 705-712] の報告が挙げられるが、いずれの例も発現させた酵素の物理化学的性質を調べたものであって、D体やピルビン酸の蓄積量についての言及は皆無である。

【0008】

つまるところ、過去においてldhを大腸菌に過剰発現させた例はあるものの、大腸菌のldhAを過剰発現させることによってD-乳酸の生産性を向上させ、且つピルビン酸蓄積量が有意に低下させることに成功したものは無かった。

【0009】

トランスポゾンを用いたピルベートデヒドロゲナーゼ (以下pdhと略することがある) の変異及び/または変異剤を用いたピルベートホルメトリアーゼに関する変異を有する変異株については1983年にチャンら [Chang, YY., J. Bacteriol., (1983) 154, 756-762] により取得されており、公知である。またこれらの株を利用したD体の生産例は報告されていない。

【0010】

大腸菌を用いてD-乳酸発酵させる場合、一般には酸素の存在は好ましくないと考えられている。なぜなら酸素のような電子受容体が存在すると、大腸菌は発酵ではなく呼吸を行うからである。酸素のような電子受容体が無い場合に限り、大腸菌は基質レベルのリン酸化のみによりエネルギー (ATP) を得、解糖系で得られた還元力 (NADH) を用いて乳酸などの還元性有機酸を生産する。そのような理由から、従来の大腸菌によるD体発酵は殆ど嫌気培養で行われている。まれに培養の前半を通気し、後半を嫌気培養するという二相培養が行われる場合もあるが、これは前半の通気培養によって十分な菌体量を確保するのが目的であり、最終的な乳酸発酵はやはり嫌気で行っている訳である。しかし実際の工業生産を想定した場合、培地に添加する安価なアミノ酸源であるコーンステープリカー (以下CSLと略することがある) 等の中には不純物となる有機酸だけでなく、D体、L体両方の乳酸が含まれるが、嫌気培養だとL体が資化されず、培地中に残存したままとなる。L体からピルビン酸を生成する反応の触媒酵素であるL-乳酸デヒドロゲナーゼは通気条件下で発現することが知られているので、もし通気条件下でも効率良く乳酸発酵させる方法があれば、その方法を用いることで培地中に含まれるL体を菌体に資化させ、光学的にも高い純度のD体を生産させることが可能となるものと期待されるが、これまでそれを実現する技術は存在しなかった。

【非特許文献1】 Zhou, S., Appl. Environ. Microbiol., (2003) 69, 399-407

【非特許文献2】 Bunch, PK., Microbiology, (1997) 143, 187-195

【非特許文献3】 Kochhar, S., Eur. J. Biochem., (1992) 208, 799-805

【非特許文献4】 Kochhar, S., Biochem. Biophys. Res. Commun., (1992) 185, 705-712

【非特許文献5】Chang, Y.Y., J. Bacteriol., (1983) 154, 756-762

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の第1の目的は、不純物有機酸として従来より微生物により乳酸を生成蓄積させた培地中からの除去が簡単ではなかったピルビン酸の蓄積量を低減化させたD-乳酸生産法を提供することにある。そして本発明の第2の目的は光学純度の高いD-乳酸を効率的に生産するD-乳酸の生産方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明者らは、これら上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) 活性が増強されかつピルベートデヒドロゲナーゼ (pdh) 活性を消失または低減化させた細菌、さらに好ましくは上記に加えてピルベートホルメートリアーゼ (pf1) の活性が低下、若しくは消失した細菌を用いることにより、ピルビン酸を始めとする副生有機酸やL-乳酸の培地中濃度を低減化させると同時に、これまでにない高い蓄積量のD-乳酸を生産させることが可能であることを見いだし本発明に到達した。

【0013】

すなわち本発明は以下のとおりである。

- 〔1〕大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) 活性が増強されかつピルベートデヒドロゲナーゼ (pdh) 活性が低減化された細菌。
- 〔2〕ピルベートホルメートリアーゼ (pf1) 活性が低減化された〔1〕に記載の細菌。
- 〔3〕細菌が大腸菌である〔1〕、〔2〕に記載の細菌。
- 〔4〕大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性が増強された大腸菌MT-10934株 (FERM P-19092)。
- 〔5〕大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性の増強が、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターの下流に大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) をコードする遺伝子が連結されている発現カセットを用いることを特徴とする〔1〕～〔4〕の何れか一項に記載の細菌。
- 〔6〕〔1〕～〔5〕の何れか一項に記載の細菌または組み換え大腸菌を培養することにより得られる培養物、菌体及びその処理物。
- 〔7〕〔1〕～〔5〕の何れか一項に記載の細菌または大腸菌を培養し、得られた培養物からD-乳酸を回収することを特徴とする、D-乳酸の生産方法。
- 〔8〕大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性が増強され、かつピルベートホルメートリアーゼ活性が低減化された細菌を培養し、得られた培養物からD-乳酸を回収することを特徴とする、D-乳酸の生産方法。
- 〔9〕細菌が大腸菌である〔8〕に記載のD-乳酸の生産方法。
- 〔10〕2種以上のアミノ酸が添加された培地で培養することを特徴とする、請求項7～9に記載のD-乳酸の生産方法。
- 〔11〕通気条件下で培養することを特徴とする〔7〕～〔10〕の何れか一項に記載のD-乳酸の生産方法。
- 〔12〕通気条件が温度30℃の水を対象とした場合常圧で酸素移動容量係数 $k_L a$ が 1 h^{-1} 以上 400 h^{-1} 以下となるような条件で達成し得る酸素供給を可能とする条件であることを特徴とする〔11〕に記載のD-乳酸の生産方法。
- 〔13〕培養pHが6～8であることを特徴とする請求項〔7〕～〔12〕の何れか一項に記載のD-乳酸の生産方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、ピルビン酸の生成量が少ないD-乳酸を生成する細菌が提供される。そ

して、本発明により作成された菌株を培養し、D-乳酸を生産することにより既存の方法に比較してより経済的に化学的純度及び光学純度の高いD-乳酸を生産することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明を詳細に説明する。まずはじめに本発明の細菌に関して以下に説明する。

【0016】

本発明における大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) とは、ピルビン酸およびNADHより、乳酸およびNADを生成する酵素活性を有する酵素でさらに具体的にはBunch, P. Kら (Microbiology 143 (Pt 1), 187-195 (1997)) が取得した遺伝子、または、大腸菌のゲノムDNAを鋳型に配列番号3および配列番号4よりPCRにより増幅されるDNAフラグメントに含まれる配列をもつ遺伝子より生産される酵素を例示できる。その至適pHは例えば6.4~7.5にある。

【0017】

大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性が増強されたとは、突然変異及び／または遺伝子組み換えにより、それらの処理を行う前の状態と比較して、例えば処理前の親株あるいは宿主と比較して、有意に大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子より生産される酵素の活性が増加した状態を指す。また、このような遺伝子組み換えに用いるD-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子には、D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が大腸菌から単離した後に変異を施し、変異前の遺伝子がコードするD-乳酸デヒドロゲナーゼに対して1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入された変異体で、D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有するものをコードする遺伝子のようなものも含む。該変異体は、たとえば、1個もしくは数個の塩基の付加、欠失もしくは他の塩基への置換を行うことにより作ることができる。1個もしくは数個の塩基の付加、欠失もしくは他の塩基への置換の手段は自体は公知であり、例えば、ランダム変異導入法、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、またはポリメラーゼ連鎖増幅法 (PCR) を単独または適宜組み合わせで行うことができる。例えば亜硫酸水素ナトリウムを用いた化学的な処理によりシトシン塩基をウラシル塩基に置換する方法や、マンガンを含む反応液中でPCRを行い、DNA合成時のヌクレオチドの取り込みの正確性を低くする方法、部位特異的変異導入のための市販されている各種キットを用いることもできる。例えばサンプルック等編 [モレキュラークロニング、ア ラボラトリーマニュアル 第2版] コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989、村松正實編 [ラボマニュアル遺伝子工学] 丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H.E. 編 [PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用] ストックトンプレス、1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができる。

【0018】

本発明においてピルベートデヒドロゲナーゼ (pdh) 活性とは、ピルビン酸より二酸化炭素とアセチルCoAを生成する酵素活性であり、該酵素活性が野生型より低下しているとは突然変異及び／または遺伝子組み換えなどの既存の方法により、それらの処理を行う前の状態と比較して、例えば処理前の親株あるいは宿主と比較して、有意に活性が低下している状態を指し、全くなくなっている状態も含む。全くなくなっているとは、既存のpdh活性測定系を用いて測定された活性が検出限界である状態を指す。

【0019】

また、既存の遺伝子破壊技術を用いてピルベートデヒドロゲナーゼ (pdh) 活性を低下、もしくは消失させるためには、ピルベートデヒドロゲナーゼをコードするサブユニットの遺伝子を破壊すれば良く、具体的にはaceE遺伝子を破壊すれば良い。

【0020】

本発明における乳酸生産用の細菌とは一般の原核細胞の微生物であり、少なくとも乳酸とピルビン酸を生産し得る細菌である。

【0021】

本発明において、ピルベートホルメートリアーゼ (p f l) 活性とは、ピルビン酸よりギ酸とアセチルC o Aを生成する酵素活性であり、該酵素活性が低下しているとは突然変異及び／または遺伝子組み換えなどの既存の方法により、それらの処理を行う前の状態よりも有意に活性が低下させた状態を指し、全くなくなっている状態も含む。全くなくなっているとは、既存の p f l 活性測定系を用いて測定された活性が検出限界である状態を指す。なお、ピルベートホルメートリアーゼは、p f l A 遺伝子と p f l B 遺伝子の2つの遺伝子の産物により構成されている。両者を区別する必要がない場合は単に p f l と記載し、p f l B 遺伝子のみを指す場合は p f l B と記載する。

【0022】

具体的には遺伝子組み換え系が開発されていて遺伝子が同定されているヘテロ乳酸発酵細菌であれば遺伝子組み換え技術を用いてピルベートデヒドロゲナーゼおよび／またはピルベートホルメートリアーゼをコードする遺伝子が破壊された細菌、上記の遺伝子に関する情報についての条件が満たされない菌体でもUV変異処理や変異剤処理を適当な条件で行って得られるピルベートデヒドロゲナーゼおよび／またはピルベートホルメートリアーゼ活性が低下した菌株を例示できる。さらに具体的にはヘテロ乳酸発酵細菌が大腸菌であり、例えば大腸菌W14851 i p 2株 (ATCC 25645) がピルベートデヒドロゲナーゼの活性が低下している菌株として例示でき、大腸菌MT-10934株、任意の大腸菌野生株のピルベートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を破壊した菌株がピルベートデヒドロゲナーゼ活性が全くない菌株として例示できる。

【0023】

また、大腸菌MT-10934株はピルベートホルメートリアーゼの活性が低下している菌株としも例示でき、更に、任意の大腸菌野生株のピルベートホルメートリアーゼをコードする遺伝子を破壊した菌株がピルベートホルメートリアーゼ活性が全くない菌株として例示できる。

【0024】

MT-10934はすでにピルベートデヒドロゲナーゼがトランスポゾンを用いた変異で完全破壊され、ピルベートホルメートリアーゼは変異剤によりその活性が低下しているため、これを用いて容易に本発明を実施することが可能である。本菌株は、寄託番号FERM P-19092として、茨城県つくば市東1丁目1番1号中央第6の、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに平成14年11月8日より寄託されている。

【0025】

大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ活性が増強された大腸菌MT-10934株 (FERM P-19092) とは、大腸菌MT-10934株に突然変異及び／または遺伝子組み換えを施すことにより、大腸菌MT-10934株よりも有意に大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼ酵素の活性が増加した状態の大腸菌を指す。具体的には本発明実施例記載のMT-10934 / p G l y l d h A株を例示できる。

【0026】

本発明の大腸菌におけるD-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の発現には、解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターとD-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を機能的に連結することが好ましい。

【0027】

この解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターとは、恒常的に大腸菌内で機能する強力なプロモーターで且つグルコース存在下でも発現の抑制を受けにくいプロモーターで、具体的にはグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーターやセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (g l y A) プロモーターが例示できる。解糖系、核酸生合成系又はアミノ酸生合成系に関わる蛋白質の発現を司る遺伝子のプロモーターの下流に大腸菌由来D-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が連結されている発現カセットを用いた遺伝子組み換えによることを

特徴とするとは、上記プロモーターの下流に大腸菌由来のD-乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が連結されている発現カセットを任意のベクターに組み込み、所望の細菌に導入するか、直接染色体上に遺伝子組み換えにより導入されていることを指す。このような細菌は通気条件下でD-乳酸を生産させる時にldhAの発現が増強されていないものと比較してD-乳酸の蓄積量が向上し、不純物のピルビン酸濃度が減少すると共にD-乳酸の光学純度を向上させることが可能となる。

【0028】

次に、本発明に係る大腸菌の培養方法並びにD-乳酸の製造法に関して説明する。本発明においては、上述した大腸菌を培地を用いて培養し、培養により得られた培地中にD-乳酸を生成蓄積せしめる。

【0029】

本発明における乳酸生産のための培養とは、培地を用いて本発明に係る細菌を培養することである。その際、使用される培地としては作成された菌体がD-乳酸を生産するために必要な栄養源を含むものであれば特に制限されない。このような栄養源としては、炭素源、窒素源、無機イオン、菌体が要求する有機微量元素、核酸及びビタミン類等が挙げられ、これらから適宜選択したものを利用して培地を調製することができる。

【0030】

より好ましい結果を得るためには、2種以上のアミノ酸を含む培地が好ましい。このようなアミノ酸の添加の形態としては、天然のアミノ酸の2種以上の組み合わせや、酵母エキス、カザミノ酸、ペプトン、ホエー、廃糖蜜、コーンステープリカー等の複数のアミノ酸を混合物として含有する天然物や天然物抽出物の加水分解物を挙げることができる。酵母エキス、ペプトン、ホエー、廃糖蜜、コーンステープリカー等より選ばれる少なくとも1種類、もしくはそれらの混合物の総量が0.5質量%から20質量%含む培地がより好ましく、1質量%から10質量%ではさらに好ましい。特にコーンステープリカーや酵母エキス添加はペプトン、カザミノ酸添加よりもさらに大きな効果が得られ、このとき硫酸アンモニウムなどの塩は添加しないほうがむしろよい結果となる。培地は通常液体培地である。

【0031】

培養はフラスコ等を用いて、その中に液体培地を入れて振とう培養してもよいが、通常は液体培地を培養槽に入れて、温度調節及び攪拌しながら行う。

【0032】

培養条件としては作成された細菌の種類や、培養装置により適宜変更可能であるが、例えばピルベートホルメトリアーゼ活性が低下しているMT-10934株を使用する場合は培養温度を20℃から40℃、より好ましくは25℃から35℃で培養することが好ましく、pHはNaOH、NH₃等で6から7、より好ましくは6.5から6.9で調整し、培養することが好ましい。培養時間は得に限定されないが、菌体が十分に増殖し、且つD-乳酸が生成するのに必要な時間である。

【0033】

また、大腸菌野生株MG1655株のpflBをコードする遺伝子を破壊してピルベートホルメトリアーゼ活性を消失させた大腸菌株を用いた場合には、中性もしくは中性よりややアルカリ性側のpHで最大の生産性を得られ、培養pHは6から8、より好ましくは7.1から7.3である。MG1655株由来pfl破壊株はMT-10934株より高温で効率良く乳酸生産をすることが可能であり、33℃から42℃で培養することで最大の生産性を得ることができる。

【0034】

培養に際して、通常は温度、pH、通気条件、攪拌速度を制御し得る培養槽を用いるのが一般的であるが、本発明の培養に際しては培養槽を使用することに限定されない。培養槽を用いて培養する場合には、必要により、予め前培養として種培養を行いこれを必要量予め調製しておいた培養槽内の培地に接種してもよい。

【0035】

MT-10934株は、培地の組成によっては、pH 7～7.5のpH領域でギ酸が生成することがある。大腸菌野生株であるMG1655株(ATCC 47076)のpflBをコードする遺伝子を破壊した株では、本発明の培養方法ではギ酸の生成は確認されない。

【0036】

本発明の細菌として大腸菌を用いる場合は、採用した菌体で中性付近のpHの培地を用いてD-乳酸を生産させた場合にギ酸の生成が観察されたときは、実際のD-乳酸の製造に際しては培地のpHを中性よりやや酸性側で制御し、ギ酸の生成が観察されない場合は実際のD-乳酸の製造に際しては培地のpHを中性もしくはややアルカリ性側に制御することで最大生産性が得られるという現象が観察される。この原因は明確ではないが、大腸菌が本来持つ、ギ酸を分解するギ酸デヒドロゲナーゼが弱酸性の培養条件で活性化されるか、ピルベートデヒドロゲナーゼが弱酸性の培養条件で抑制されたため、ギ酸の生産量が低下してギ酸による細胞に対する毒性が緩和されるためではないかと類推される。

【0037】

本発明の培養時の通気条件は、通気を全く行わなくともD-乳酸を生産することは可能であるが、より好ましい結果を得るために通気を行ったほうがよい。特に培地にあらかじめL-乳酸が混入する場合はL-乳酸が減少するのに十分な時間通気が行われるのが好ましい。ここで言う通気条件下とは必ずしも培養液中を空気が通過する必要はなく、培養槽の形状によっては適度に培養液を攪拌しながら培養液上の空気層が換気されるような上面通気も含み、培養槽の内部に酸素を含む気体を流入させることを意味する。培養槽内の培養液中に通気する場合は培養槽の内圧、攪拌羽根位置、攪拌羽根形状、攪拌速度の組み合わせにより溶存酸素濃度が変化するためにD-乳酸の生産性および次のような指標により最適条件を求めることができる。例えば上記大腸菌をABLE社製培養装置BMJ-01等の比較的小型の培養槽で培養する場合は、500gの培養液を使用した際、空気を常圧で0.01vvm～1vvm、攪拌速度50rpm～500rpm、より好ましくは、常圧で0.1vvm～0.5vvm、攪拌速度100rpm～400rpmで達成し得る通気条件で好ましい結果を得ることができる。

【0038】

以上のような通気条件は通気攪拌条件が温度30℃の水を対象とした場合常圧で酸素移動速度係数 $k_L a$ が 1 h^{-1} 以上 400 h^{-1} 以下より好ましくは 1 h^{-1} 以上 200 h^{-1} 以下となる条件で達成し得る酸素供給を可能とする条件である。また、最適な通気条件の別の指標としてはMT-10934株が嫌気培養で通常生産するギ酸、酢酸、コハク酸、グリセロール、エタノール等がすべて 5.0 g/L 以下、さらに好ましくは 1.0 g/L 以下になり且つ、D-乳酸が生産されるような通気量、攪拌速度により達成される通気条件である。また、最適な通気条件の別の指標としては0.3%のL-乳酸を含む培養液でMT-10934株を培養した際に10時間以上100時間以内にL-乳酸の濃度が0.02質量%以下に低下するような通気量、攪拌速度である。

【0039】

また、通気量の別の指標としては嫌気条件よりもグルコースの消費速度が向上する範囲の通気量、攪拌速度である。

【0040】

上述した通気条件は培養初期から終了まで一貫して行う必要はなく、培養工程の一部で行うことでも好ましい結果を得ることができる。

【0041】

本発明における培養物とは、上述した方法により生産された菌体、菌体を含む培養液、菌体が除去されている培養液、及びそれらの処理物を指す。

【0042】

本発明におけるD-乳酸を回収するとは、例えば培養液からならば通常知られた方法が利用でき、例えば、培養物を酸性化した後直接蒸留する方法、乳酸のラクチドを形成させて蒸留する方法、アルコールと触媒を加え乳酸をエステル化した後蒸留する方法、有機溶

媒中に乳酸を抽出する方法、乳酸をイオン交換カラムで分離する方法、電気透析により乳酸を濃縮分離する方法などやそれらを組み合わせた方法が採用できる。また、本発明の方法により生産された菌体は、乳酸の生産に適した酵素群を生産していることから、菌体を回収して再利用する方法、別プロセスでリアクター反応に利用する方法、酵素群を回収して反応に用いる方法などにより乳酸を生産し、生産された乳酸を回収することも、培養物から乳酸を回収する工程を有する本発明の製造方法に含まれる。

【実施例】

【0043】

以下に実施例により本発明の一例を示すが、これらは本発明をなんら制限するものではない。

実施例 1 (MT-10934 株による D-乳酸生産)

培養に使用する培地の組成を下記表 1 に記載する。なお、特に記載しない限りは「%」は質量基準である。

【0044】

【表 1】

表 1 培地組成

ブドウ糖	10%
コーンステープリカー (日本食品化工製)	5%
硫酸アンモニウム	0.5%
リン酸水素二ナトリウム 12 水和物	0.3%
リン酸二水素カリウム	0.15%
塩化ナトリウム	0.15%
硫酸マグネシウム 7 水和物	0.1%
アデカノール LG 126	0.1%

(残部: 水)

本培地にはコーンステープリカー由来の酸加水分解後の還元糖 0.34%、D-乳酸 0.31%、L-乳酸 0.31%、遊離アミノ酸 0.33% 及び微量の各種有機酸が含まれている。

【0045】

三角フラスコに入れた LB Broth, Miller 培養液 (Difco 244620) 25ml に D-乳酸生産菌 MT-10934 株と大腸菌 MG1655 株 (ATCC 47076) を植菌し、一晚 120 rpm で攪拌培養を行い前培養液を調製した。1L 容培養槽 (ABLE 社製培養装置 BMJ-01) に上記組成の培地 475g を入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気量 0.5vvm、攪拌速度 150 rpm、培養温度 31℃、pH 6.7 (NaOH で調整) でグルコースが完全に消費されるまで行った。

【0046】

培養終了後、培養液中の有機酸の定量および光学純度の測定は HPLC で定法に従って測定した。結果を表 2 に示す。

【0047】

【表2】

表 2

	MG1655(wild)	MT-10934
D-乳酸蓄積量	54.9g/kg培養液	90.5g/kg培養液
培養液回収量	540g	570g
乾燥菌体重量	3.5g/L	2.2g/L D-乳
酸光学純度	99.9%ee以上	99.9%ec以上
コハク酸	6.25g/L	N.D <0.5g/L
ギ酸	1.89g/L	N.D <0.1g/L
酢酸	2.45g/L	N.D <0.1g/L
エタノール	0.8g/L	N.D <0.1g/L
ピルビン酸	0.6g/L	6.2g/L
培養開始50hr後のD-乳酸蓄積量	46.5g/kg	58.2g/kg

N.D:Not detected (検出されず)

上記結果において、総乳酸量が培養開始時に加えたグルコース量に基づく生産量を上まわっている原因はコーンステイプリカー中の炭素源を利用したためと考えられる。しかしながら、コーンステイプリカー中の還元糖、有機酸、アミノ酸をすべて使用したとしても90%以上の変換率を達成した。また、この結果よりピルベートデヒドロゲナーゼ及びピルベートホルメトリアーゼの欠損により乳酸の生産性が向上し、大腸菌が本来生産する主要な有機酸の大部分が減少するものの、ピルビン酸が増加するという問題があることが判明した。なお、野生株であるMG1655株はアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)よりATCC47076として入手できる。

【0048】

実施例2 (D-乳酸デヒドロゲナーゼ発現ベクターおよびD-乳酸生産菌の構築)

セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(serine hydroxymethyltransferase) (glyA) プロモーターを取得するため大腸菌ゲノムDNAをテンプレートに用いて配列番号1、及び配列番号2をプローブとして用いてPCR法により得られたDNAフラグメントを制限酵素EcoRIで消化することで約850bpのglyAプロモーターをコードするフラグメントを得た。さらにD-乳酸デヒドロゲナーゼ(ldhA)をコードする遺伝子を取得するために大腸菌ゲノムDNA(ATCC47076株から実施例1と同じく定法により抽出して取得した)をテンプレートに用いて配列番号3、及び配列番号4をプローブとして用いてPCR法により得られたDNAフラグメントを制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで約1.0kbpのD-乳酸デヒドロゲナーゼ(ldhA)をコードする遺伝子フラグメントを得た。上記の2つのフラグメントとベクタープラスミドpUC18を制限酵素EcoRI及びHindIIIで消化することで得られるフラグメントとを混合し、DNAリガーゼを用いて結合した後、大腸菌(DH5α株)に形質転換することによりプラスミドpGlyldhAを得た。

【0049】

得られたプラスミドpGlyldhAを大腸菌W1485lip2(ATCC25645)および大腸菌MT-10934株に形質転換することによりD-乳酸生産菌W1485lip2/pGlyldhAおよびMT-10934/pGlyldhA株を得た。

【0050】

尚、W14851ip2はアメリカンタイプカルチャーコレクションよりATCC25645として入手できる。ベクタープラスミドpUC18はアメリカンタイプカルチャーコレクションより入手できるATCC37253から定法により抽出することにより得られる。また、MT-10934株は、先に記載したとおり、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託されている。

実施例3 (D-乳酸生産菌W14851ip2/pGlyldhAによるD-乳酸生産)

培養に使用する培地の組成を下記表3に記載する。

【0051】

【表3】

表3 培地組成

G l u c o s e	50	g / L
硫安	10	g / L
K ₂ HPO ₄	1	g / L
N a C l	2	g / L
M g S O ₄	0.5	g / L
C a C l ₂	0.1	mM
D L - リポ酸	1	μ g / L

(残部: 水)

三角フラスコにいったLB Broth, Miller培養液(Difco244620) 25mlにD-乳酸生産菌W14851ip2、およびW14851ip2/pGlyldhAを別々に植菌し、一晚120rpmで攪拌培養を行い前培養液を調製した。1Lの培養槽(ABLE社製培養装置BMJ-01)に上記表3に記載の培地475gを入れたものに先の前培養液をそれぞれ別々に全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度600rpm、培養温度37℃、pH7.3(NaOHで調整)で24時間行った。培養終了後、培養液中のD-乳酸の定量および光学純度の測定はHPLCで定法に従って測定した。結果を表4に示す。

【0052】

【表4】

表4

	W14851ip2	W14851ip2/pGlyldhA
D-乳酸蓄積量	4 g / kg 培養液	17 g / kg 培養液

実施例4 (D-乳酸生産菌MT-10934/pGlyldhA株によるD-乳酸生産)

出証特2004-3095508

三角フラスコにいったLB Broth, Miller培養液(Difco244620)25mlに実施例2で得られたD-乳酸生産菌MT-10934/pGlyldhA株を植菌し、前培養液を調製し、実施例1に記載の方法で培養を行った。培養終了後、培養液中のD-乳酸の定量および光学純度の測定はHPLCで定法にしたがって測定した。結果を表5に示す。

【0053】

【表5】

表5

D-乳酸蓄積量	94 g / kg 培養液
培養液回収量	570 g
乾燥菌体重量	2.0 g
D-乳酸光学純度	99.9% ee 以上
ピルビン酸	1.8 g / L
培養開始50hr後のD-乳酸蓄積量	65.2 g / g

上記結果において、総乳酸量が培養開始時に加えたグルコース量に基づく生産量を上まわっている原因はコーンステイプリカー中の炭素源を利用したためと考えられる。しかしながら、コーンステイプリカー中の還元糖、有機酸、アミノ酸をすべて使用したとしても90%以上の変換率を達成した。この結果と実施例1の結果の比較よりldhAの強化により培養50hr後のD-乳酸蓄積量が向上し、生産速度が向上したことが判明した。また、不純物であるピルビン酸の蓄積量が減少した。

【0054】

実施例5 (大腸菌pflB遺伝子の近傍領域のクローニング)

大腸菌MG1655株のゲノムDNAを、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) 記載の方法により調製した。また、遺伝子データベース (E. coli GenBank) 中のMG1655株完全長塩基配列 (accession number U00096) を基にpflBをコードする遺伝子 (2,283bp) の塩基配列 (accession number b0903) 近傍領域をクローニングするため、配列番号5、6、7及び8に示すオリゴヌクレオチドプライマーを4種合成した。配列番号6、7のプライマーは5'末端側にSphI認識部位を有している。

【0055】

前記染色体DNA 1μgを用いて、配列番号5と配列番号6、配列番号7と配列番号8の組み合わせで、上記プライマーDNA各々100pmol、および通常の条件でPCRを行なうことにより約1.8kb及び、約1.3kbのDNA断片を増幅した。このDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分離、回収した。配列番号5と配列番号6を用いて増幅された断片の5'末端近傍にはHindIIIサイトが存在するので、この断片をHindIIIおよびSphIで消化した。また、配列番号7と配列番号8を用いて得られた断片の3'末端近傍にはPstIサイトが存在するので、この断片をSphIおよびPstIで両端を消化した。この消化断片2種とプラスミドpUC18 (宝酒造) のHindIIIおよびPstI消化物とをT4DNAリガーゼで反応した後、大腸菌DH5α株を形質転換して、pflB遺伝子の5'上流近傍断片及び3'下流近傍断片の2つの断片を含むプラスミドを得て、このプラスミドをpUCΔpflBと命名した。

【0056】

さらに、プラスミド pUCΔpflB を Sph I で消化後、T4 DNA ポリメラーゼにより平滑末端にした。ここに ATCC 37033 より抽出して得られる pACYC184 を Hae III で消化して得られる、クロラムフェニコール耐性領域を含む約 1.3 kb の DNA 断片を T4 DNA polymerase により平滑末端にしたフラグメントを挿入し、大腸菌 DH5α 株を形質転換して、クロラムフェニコール耐性領域が挿入されたプラスミドを得、このプラスミドを pUCΔpflB : Cmr と命名した。

【0057】

実施例 6 (大腸菌 MG1655 株 pflB 遺伝子破壊株の作製)

実施例 5 で得られたプラスミド pUCΔpflB : Cmr で大腸菌 MG1655 株を形質転換し、クロラムフェニコール 10 μg/ml、アンピシリン 50 μg/ml を含む LB 寒天プレートに塗布し、37℃で一晩培養した。得られた形質転換体をクロラムフェニコール 10 μg/ml を含む LB 液体培地中で培養した。得られた培養液を希釈してクロラムフェニコール 10 μg/ml を含む LB 寒天培地に塗布し、これをアンピシリン 50 μg/ml を含む LB 寒天プレートにレプリカを行い、クロラムフェニコール耐性、かつアンピシリン感受性の株を取得することで、pUCΔpflB : Cmr が MG1655 株の染色体に相同組換えにより挿入されたのち、pUCΔpflB : Cmr と染色体上の相同領域で相同組換えが起こり、pflB をコードする遺伝子の領域がクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換したと予想される候補株を複数得た。

【0058】

これらの候補株の染色体 DNA を鋳型として、配列番号 9 および配列番号 10 を用いて PCR により pflB 近傍領域を含む断片を増幅させ、pflB 領域がクロラムフェニコール耐性領域に置換されたサイズ (約 3.0 kb) に該当する断片が増幅されることを確認した。さらに、候補株の染色体 DNA に対して pflB をコードする遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、pflB をコードする遺伝子が検出されない株を選抜した。以上を満足するクローンを pflB 欠失株とし、得られた株を MG1655ΔpflB 株と命名した。

【0059】

実施例 7 (大腸菌 MG1655 株 pflB 遺伝子破壊株による D-乳酸の生産)

前培養として三角フラスコに LB Broth, Miller 培養液 (Difco 244620) 25 g を入れたものを複数用意した。これに D-乳酸生産菌 MG1655 株、MG1655ΔpflB 株、および MG1655ΔpflB 株に実施例 2 に記載のプラスミド pGlyldhA を定法により組み換えた MG1655ΔpflB / pGlyldhA 株の 3 種類の菌株を別々に植菌し、一晩、30℃、120 rpm で攪拌培養を行った後、1 L 容の培養槽 (ABLE 社製培養装置 BMJ-01) に表 6 に示す培地 475 g を入れたものにそれぞれ全量植菌した。培養は大気圧下、通気量 0.5 vvm、攪拌速度 200 rpm、培養温度 31℃、pH 6.7 (NaOH で調整) で 50 時間行った。培養終了後、得られた培養液中の D-乳酸の定量および光学純度の測定は HPLC で定法に従って測定した。結果を表 7 に示す。

【0060】

【表6】

表6 培地組成

Glucose	100 g/L
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6.0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.0 g/L
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L
NaCl	3.0 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g/L
酵母エキス	0.5 g/L
カザミノ酸	5.0 g/L
(残部: 水)	

【0061】

【表7】

表7	MG1655	MG1655 ΔpflB	MG1655 ΔpflB /pGlyldhA
D-乳酸蓄積量	28 g/L	58 g/L	63.7 g/L

この結果からldhA強化により乳酸生産速度が向上することが判明した。

【0062】

実施例8 (MG1655 ΔpflB株によるD-乳酸の生産)

前培養として三角フラスコに入れた培養液25gにMG1655株、MG1655 ΔpflB株、およびMG1655 ΔpflB /pGlyldhA株を別々に植菌し、一晚30℃、120rpmで攪拌培養を行った後、1L容培養槽 (ABLE社製培養装置BMJ-01) に表8に示す培地475gを入れたものに別々に全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度300rpm、培養温度35℃、pH7.2 (NaOHで調整) で24時間行った。培養終了後、得られた培養液中のD-乳酸およびピルビン酸の測定はHPLCで定法に従って測定した。結果を表9に示す。

【0063】

【表8】

表8 培地組成

ブドウ糖	10 %
コーンスティープリカー (日本食品化工製)	5 %
アデカノールLG126	0.1 %
(残部: 水)	

【0064】

【表 9】

表9

	MG1655	MG1655 Δ pflB	MG1655 Δ pflB /pGlyldhA
D-乳酸蓄積量	52g/L	95g/kg培養液	95g/kg培養液
培養液回収量	520g	560g	560g
乾燥菌体重量	2.5g/L	2.5g/L	2.5g/L
ピルビン酸	1.1g/L	1.1g/L	0.3g/L

上記結果において、総乳酸量が培養開始時に加えたグルコース量に基づく生産量を上まわっている原因はコーンステイプリカー中の炭素源を利用したためと考えられる。しかしながら、コーンステイプリカー中の還元糖、有機酸、アミノ酸を全て使用したとしても90%以上の変換率を達成した。

この結果から、培地組成を変更することにより、乳酸の生産速度がさらに向上することが判明した。また、培地組成を変更してもピルビン酸蓄積量が減少する効果があることが判明した。

【0065】

実施例10 (大腸菌MG1655株aceE遺伝子破壊株によるD-乳酸の生産)

配列番号11と配列番号12、配列番号13と配列番号14の組み合わせで実施例5の方法にしたがってaceEをコードする遺伝子を破壊するためのプラスミドを作成した。さらに実施例6に記載の方法で大腸菌MG1655株のaceEをコードする遺伝子を破壊した株を作成し、これをMG1655 Δ aceE株とした。

【0066】

前培養として三角フラスコにいた培養液25gにD-乳酸生産菌MG1655株、MG1655 Δ aceE株、およびMG1655 Δ aceE株に実施例2に記載のプラスミドpGlyldhAを定法により組み換えたMG1655 Δ aceE/pGlyldhA株の3種類の菌株をそれぞれ植菌し、一晚30℃、120rpmで攪拌培養を行った後、1L容培養槽(ABLE社製培養装置BMJ-01)に表6に示す培地475gを入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気量0.5vvm、攪拌速度200rpm、培養温度31℃、pH6.7(NaOHで調整)でグルコースが枯渇するまで行った。培養終了後、得られた培養液中のD-乳酸の定量および光学純度の測定はHPLCで定法にしたがって測定した。結果を表10に示す。

【0067】

【表10】

表10	MG1655	MG1655 Δ aceE	MG1655 Δ aceE /pGlyldhA
D-乳酸蓄積量	45g/L	53g/L	58g/L
ピルビン酸蓄積量	0.8g/L	4.1g/L	1.8g/L

この結果よりldhAの強化の効果はピルベートデヒドロゲナーゼの活性が全くなかった株に対しても乳酸の生産性を向上し、ピルビン酸の蓄積量を減少させることが判明した。

。

【0068】

実施例11 (MG1655 Δ pflB/pGlyldhA株によるD-乳酸の高蓄積生

産)

前培養として三角フラスコにいた培養液 25 g に MG1655 Δ p f l B / p G l y l d h A 株を植菌し、一晚 120 r p m で攪拌培養を行った後、ABLE 社製培養装置 B M J - 01 の培養槽に表 11 に示すグルコース濃度を 10 % ~ 15 % まで変化させた培地 475 g を入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気量 0.5 v v m、攪拌速度 300 r p m、培養温度 35 °C、p H 7.2 (NaOH で調整) でグルコースが枯渇するまで行った。培養終了後、D-乳酸の測定は H P L C で定法にしたがって測定した。結果を表 12 に示す。

【0069】

【表 11】

表 11 培地組成

ブドウ糖	10 %、12 %、15 %
コーンステイープリカー (日本食品化工製)	5 %
アデカノール L G 126	0.1 %

【0070】

【表 12】

表 12

グルコース濃度	10 %	12 %	15 %
D-乳酸蓄積量	95g/kg培養液	114g/kg培養液	128g/kg培養液
培養液回収量	560g	569g	581g
乾燥菌体重量	2.5g/L	2.5g/L	2.5g/L

総乳酸量が培養開始時に加えたグルコース量に基づく生産量を上まわる原因はコーンステイープリカー中の炭素源を利用したためと考えられる。しかしながら、コーンステイープリカー中の還元糖、有機酸、アミノ酸をすべて使用したとしても 90 % 以上の変換率を達成し、かつ 130 g / L というこれまでにない高い蓄積量を達成した。

【0071】

実施例 12 (MG1655 Δ p f l B / p G l y l d h A 株によるコーンステイープリカー添加量の検討)

前培養として三角フラスコにいた培養液 25 g に MG1655 Δ p f l B / p G l y l d h A 株を植菌し、一晚 120 r p m で攪拌培養を行った後、ABLE 社製培養装置 B M J - 01 の培養槽に表 13 に示すコーンステイープリカー濃度を 1 ~ 10 % まで変化させた培地 475 g を入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気量 0.5 v v m、攪拌速度 300 r p m、培養温度 35 °C、p H 7.2 (NaOH で調整) で 24 時間行った。培養終了後、D-乳酸の測定は H P L C で定法にしたがって測定した。結果を表 14 に示す。

【0072】

【表13】

表13 培地組成

ブドウ糖	10%
CSL (日本食品化工製)	1%、2.5%、5%、10%
アデカノールLG126	0.1%

【0073】

【表14】

表14

CSL	1%	2.5%	5%	10%
D-乳酸蓄積量	58 g/L	92 g/L	96 g/L	97 g/L

1%のコーンステープリカー添加区はこの中では最も低い生産性であるが24時間で58 g/Lと従来にない生産速度である。また、使用したグルコースに対するD-乳酸への変換率は90%以上を維持していた。

【0074】

実施例13 (MG1655ΔpflB/pGlyldhA株による通気条件による解糖速度への影響)

前培養として三角フラスコにいた培養液25 gにMG1655ΔpflB/pGlyldhA株を植菌し、一晚120 rpmで攪拌培養を行った後、ABLE社製培養装置BMJ-01の培養槽に表15に示す培地475 gを入れたものに全量植菌した。培養は大気圧下、通気条件は表16に示す条件、培養温度35℃、pH7.2 (NaOHで調整)で24時間行った。残存グルコース量はグルコースCII-テストワコー (和光純薬工業)により測定した。

【0075】

【表15】

表15 培地組成

ブドウ糖	12%
CSL (日本食品化工製)	5%
アデカノールLG126	0.1%

(残部：水)

【0076】

【表 16】

表 16

試験区	1	2	3	4
通気量 (vvm)	0	0.5	0.5	0.5
攪拌速度 (rpm)	200	200	400	600

【0077】

【表 17】

表 17

試験区	1	2	3	4
グルコース残存量 (g/L)	59.4	36.6	20.1	54.5

この試験により通気条件が向上するに従い解糖速度が向上し、通気条件を向上させすぎると解糖速度が低下することがわかる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mitsui Chemicals, Inc.

<120> A Bacterium capable of producing high-pure D-lactic acid in a high level

<130> P0002578

<160> 14

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

ggaattcgtc gaccggctcc agttcgaagc tggt 34

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

ggaattctga ctcagctaac aataaaattt tt 32

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

ggaattccgg agaaagtctt atgaaact 28

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

cccaagcttt taaaccagtt cggttcgggc 29

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

gcacgaaagc ttgattacg 20

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

ttattgcatg cttagatttg actgaaatcg 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

ttattgcatg cttatttact gcgtacttcg 30

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

aaggcctacg aaaagctgca g 21

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

tcacgcgagc tattatcagt cgttattatc 30

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

tccaccgtgt tgattgttgt tgctaa 26

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

tttgaattct gccactgaat agcagccag 29

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

ttggatccaa cggtgagttt tctggaacc 29

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

ttttggatcc gaggtaaaag aataatggc 29

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<200>

<223> primer

<400>

ccaccttcgg ccacggcagc 20

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 不純物有機酸として従来より微生物によりD-乳酸を生成蓄積させた培地中からの除去が容易ではなかったピルビン酸の蓄積量を低減化させたD-乳酸生産法を提供すること、更には、光学純度の高いD-乳酸を効率的に生産するD-乳酸の生産方法を提供すること。

【解決手段】 ピルベートデヒドロゲナーゼ (p d h) 活性を低減化または消失させ、かつD-乳酸デヒドロゲナーゼ活性を増強したヘテロ乳酸醗酵細菌を、培養して乳酸を製造する。

【選択図】 なし

特願 2003-342165

出願人履歴情報

識別番号

[000005887]

- | | |
|----------|-------------------|
| 1. 変更年月日 | 1997年10月 1日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号 |
| 氏 名 | 三井化学株式会社 |
| | |
| 2. 変更年月日 | 2003年11月 4日 |
| [変更理由] | 住所変更 |
| 住 所 | 東京都港区東新橋一丁目5番2号 |
| 氏 名 | 三井化学株式会社 |